

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Dominik Pinkas

Mechanismy antimikrobiálního účinku lipopeptidů produkovaných *Bacillus subtilis*

Mode of action of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Gabriela Seydlová, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 08. 2012

.....

Děkuji RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. za pomoc při shromažďování zdrojů, za cenné rady a připomínky, i všem ostatním, kteří přispěli radou nebo doporučením.

Abstrakt

Bakteriální antimikrobiální látky jsou důležitým zdrojem nových antimikrobiálních terapeutik, jejichž hledání je jedinou možnou odpovědí na vzestup bakteriálních rezistencí proti stávajícím antibiotikům, a na stále častější výskyt multirezistentních kmenů. Zajímavou alternativu představují tři rodiny lipopeptidů produkované *Bacillus subtilis* - surfaktiny, fengyciny a ituriny - nabízející slibné biologické aktivity a dobrý potenciál pro modifikace jejich struktur a vlastností.

Lipopeptidy produkované *B. subtilis* jsou povrchově aktivní látky schopné snižovat povrchové napětí na fázových rozhraních. Vykazují biologické aktivity založené na jejich schopnosti inzerovat se do lipidických membrán, agregovat v nich a narušovat tak jejich bariérovou funkci. Přesný mechanismus účinku se liší podle rodiny, ale mají společnou koncentrační závislost – s rostoucí koncentrací membránově vázaného lipopeptidu postupně tvoří iontové kanály, později větší póry a nakonec membránu solubilizují detergentním mechanismem. Surfaktin je navíc schopen inaktivovat enzymy vyžadující pro svou aktivitu dvojmočné kationty. Tyto vlastnosti činí z lipopeptidů *B. subtilis* slibné látky pro komerční využití.

Klíčová slova: lipopeptidy, *Bacillus subtilis*, surfaktin, fengycin, iturin, mechanismus účinku, membrána, antimikrobiální peptidy

Abstract

Increasing bacterial resistance to classical antibiotics and emergence of multi-resistant strains impose a constant threat. Antimicrobial compounds of bacterial origin are an important source of new antibacterial therapeutic agents needed to answer this issue. Three families of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* – surfactins, fengycins and iturins represent an interesting class of such compounds. They exert a wide range of biological activities and possess a good potential for modifications and improvement of their structure and function.

Lipopeptides produced by *B. subtilis* are surface active compounds capable of reducing surface/interface tension. The variety of their biological activities stems from their ability to insert into lipid membranes leading to disruption and permeabilization of the membrane. Specific mode of action differs between the three families but the common feature is that it is concentration dependent. First, lipopeptides induce ion leakage, pore formation and then the increasing concentration eventually causes complete solubilisation of the membrane in a detergent-like manner. In addition, surfactin can inhibit some enzymes by chelating divalent cations required for their activity. These properties make the *B. subtilis* lipopeptides promising compounds for commercial applications.

Key words: lipopeptides, *Bacillus subtilis*, surfactin, fengycin, iturin, mode of action, membrane, antimicrobial peptides

Obsah

1. Úvod	7
2. Antimikrobiální látky	7
3. Klasifikace bakteriálních antimikrobiálních látek	9
3.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy - bakteriocíny	9
3.1.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální látky gram-pozitivních bakterií.....	9
3.1.2 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální látky gram-negativních bakterií.....	12
3.2 Neribozomálně syntetizované antimikrobiální látky	13
4. Lipopeptidy produkované <i>Bacillus subtilis</i>	18
4.1 Surfactiny.....	18
4.1.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti surfaktinů	18
4.1.2 Interakce surfaktinu s membránami	20
4.2 Fengyciny.....	24
4.2.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti fengycinů.....	24
4.2.2 Interakce fengycinu s membránami.....	26
4.3 Ituriny.....	28
4.3.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti iturinů	28
4.3.2 Interakce iturinu s membránami	31
4.4 Biologické aktivity lipopeptidů produkovaných <i>Bacillus subtilis</i>	32
5. Závěr	33
Seznam citované literatury	34

1. Úvod

Od poloviny minulého století používá lidstvo antibiotika k léčbě onemocnění způsobených patogenními mikroorganismy. Jejich intenzivní až neuvážené využívání nejen v medicíně, ale i v průmyslu urychluje vývoj rezistentních kmenů patogenů, a postupně tak omezuje účinnost stávajících terapeutik. Některá onemocnění způsobovaná bakteriálními původci, která byla považována za překonaná, se opět stávají hrozbou. Příprava a modifikace derivátů již používaných antibiotik se ukazuje jako nedostatečný přístup pro řešení tohoto rostoucího problému, a je proto nutné hledat nové látky účinné i proti multirezistentním patogenům. Kromě přípravy syntetických molekul jsou zdrojem nových látek živé organismy. Prakticky všechny živé organismy, od obratlovců včetně člověka, přes bezobratlé a rostliny až po mikroorganismy samotné produkují v nějaké formě látky inhibující růst mikroorganismů. Nejbohatším zdrojem těchto struktur jsou již od počátku výzkumu antimikrobiálních látek půdní mikroorganismy. Jedním z možných kandidátů na antibiotika nové generace jsou lipopeptidy produkované *Bacillus subtilis* vykazující široké spektrum biologických aktivit, které mají velký potenciál pro využití nejen v medicíně, ale i průmyslu a zemědělství. V posledních letech se majoritní podíl publikací o problematice lipopeptidů zaměřuje na popis jejich rozličných účinků a aktivit, kterých lze komerčně využít. Pro efektivní a bezpečné využití jakékoli látky je ovšem esenciální detailní znalost jejího mechanismu účinku.

Cílem této práce proto bylo vytvořit přehled lipopeptidů produkovaných *Bacillus subtilis* v kontextu ostatních antimikrobiálních látek bakteriálního původu a na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností popsat na molekulární úrovni mechanismy jejich antimikrobiálních účinků a faktory, které tyto aktivity ovlivňují.

2. Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky produkované živými organismy (pomineme-li látky typu etanolu nebo reaktivních kyslíkatých radikálů) jsou většinou relativně malé molekuly převážně peptidické povahy. Tato skupina ale zahrnuje i lipopeptidy, glykolipidy, glykopeptidy a jiné látky rozmanitého chemického charakteru. Velikostní rozpětí sahá od miniaturního dipeptidu bacilysinu (Rogers et al. 1965) po až 100 kDa proteiny v případě kolicinů (Timmis 1972). Produkují je prakticky všechny živé organismy od nejjednodušších prokaryot přes rostliny až po člověka (Zasloff 2002; Wang et al. 2009). Antimikrobiální látky slouží v první linii antimikrobiální obrany hostitele, v modulaci imunitní odpovědi u mnohobuněčných

organismů a jako prostředek mezidruhové kompetice nebo vnitrodruhové komunikace u mikroorganismů obývajících stejný habitat (López-Meza et al. 2011). Tyto látky vykazují aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů - gram-pozitivních i gram-negativních bakterií, kvasinek, plísní a obalených virů, a dokonce i proti některým rakovinným buňkám, aniž by významně poškozovaly zdravé buňky hostitelského organismu (Schweizer 2009; Wang et al. 2009). Tyto vlastnosti z nich činí velmi zajímavé látky z hlediska medicínského i biotechnologického využití jako slibných nástupců dnes používaných antibiotik (Giuliani et al. 2007; Lavery et al. 2011).

Živočichové produkují mnoho typů různých antimikrobiálních látek, které jsou důležitou složkou vrozené imunitní odpovědi. Jsou syntetizovány především tkáněmi vystavenými riziku infekce, jako je kůže a epitel trávicího a dýchacího ústrojí, tukovým tělesem a hemocyty hmyzu a některými buňkami imunitního systému obratlovců. Chemicky se většinou jedná o malé kationtové (ale i aniontové) peptidy, obsahující mezi 20 a 100 aminokyselinovými zbytky (NissenMeyer a Nes 1997). Vznikají proteolytickým štěpením větších proteinů a vykazují membranolytickou nebo permeabilizační a imunomodulační aktivitu (Giuliani et al. 2007; López-Meza et al. 2011; Maroti et al. 2011).

V rostlinách plní antimikrobiální látky funkci rychlé imunitní odpovědi, a zastupují tak chybějící adaptivní imunitu. Chemicky jsou rostlinné antimikrobiální látky převážně krátké peptidy (2-10 kDa) bohaté na cystein a obsahující několik disulfidických můstků. Jejich význam dokládá fakt, že v některých druzích bylo objeveno až několik set genů, které pravděpodobně kódují antimikrobiální peptidy (Silverstein et al. 2007). Rostliny antimikrobiální peptidy syntetizují jak konstitutivně, tak v reakci na infekci a dokážou je i sekretovat (Garcia-Olmedo et al. 2001). Zásahovým místem všech těchto peptidů je cytoplazmatická membrána (López-Meza et al. 2011; Maroti et al. 2011).

Bakteriální antimikrobiální látky za určitých podmínek (stacionární fáze, dostatečná hustota populace, hladovění) produkují prakticky všechny bakteriální druhy, gram-pozitivní, gram-negativní i Archea. Jsou chemicky i funkčně velmi různorodé – patří mezi ně různé peptidy a proteiny (bakteriocíny), lipopeptidy (daptomycin, surfaktin), glykopeptidy (vankomycin), glykolipidy (rhamnolipidy) a polyketidy (tetracyklin). Pravděpodobně neslouží pouze jako prostředek mezidruhové kompetice, ale některé jsou v rámci mechanismu quorum-sensing také nástroji komunikace zprostředkovávajícími diferenciaci buněk a tvorbu biofilmů. Jiné svým producentům také usnadňují pohyb a získávání živin (López-Meza et al. 2011; Maroti et al. 2011).

Kromě přírodních antimikrobiálních látek jsou vyvíjeny a studovány látky různým způsobem modifikované či zcela umělé, s cílem vytvořit látky s výhodnějšími vlastnostmi či snazší produkcí. Z důvodu značné časové i finanční náročnosti získávání dostatečného množství čisté látky z přirozeného producenta je výhodnější produkovat požadované látky rekombinantně například v *E. coli* pod silným indukibilním promotorem (Li 2011). Velmi malé molekuly je také možné syntetizovat chemicky. Syntetické acylované tetrapeptidy vykazují slibnou antimikrobiální aktivitu (Lavery et al. 2010).

3. Klasifikace bakteriálních antimikrobiálních látek

Vzhledem k nepřehlednému množství známých i nově objevovaných antimikrobiálních látek a jejich diverzitě (přehled viz databáze APD Wang et al. 2009) nebylo zatím zavedeno jednotné třídění. Tato práce si proto, mimo jiné, klade za cíl na základě publikovaných klasifikací sestavit návrh zjednodušeného systému – ten dělí antimikrobiální látky na ribozomálně syntetizované peptidy a na látky syntetizované velkými proteinovými komplexy.

3.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy - bakteriocíny

Bakteriocíny jsou ribozomálně produkovány antibakteriální peptidy, které jsou různou měrou posttranslačně modifikovány. Produkce antimikrobiálních látek bakteriemi byla poprvé pozorována u *E. coli*, proto byly tyto látky nejdříve označeny jako kolicíny (Gratia 1925. převzato z Cotter et al. 2005). Když byla produkce substancí inhibujících růst jiných mikroorganismů prokázána i u gram-pozitivních bakterií, zejména bakterií mléčného kvašení, byly pojmenovány obecněji bakteriocíny. Název kolicíny se omezil pouze na antimikrobiální proteiny produkovány gram-negativními bakteriemi (Cotter et al. 2005).

3.1.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální látky gram-pozitivních bakterií

Antimikrobiální peptidy produkovány gram-pozitivními bakteriemi jsou většinou rozdělovány na tři základní třídy (Tab. 1). Bakteriocíny I. třídy se také nazývají lantibiotika, protože jejich určujícím prvkem je přítomnost aminokyseliny lanthioninu. II. třída se skládá z peptidů, které lanthionin neobsahují, a III. třída zahrnuje velké termolabilní proteiny, které někteří autoři řadí do zvláštní skupiny bakteriolyzínů, tj. vyčleňují je z bakteriocínů (Cotter et al. 2005).

Jako **lantibiotika** se označují termostabilní posttranslačně modifikované antimikrobiální peptidy obsahující intramolekulární cyklické struktury tvořené aminokyselinami lanthioninem

nebo methyllanthioninem (lantibiotic - lanthionin containing antibiotic), které vznikají dehydratací serinových nebo treoninových zbytků a následnou cyklizací thioéterovou vazbou přes cystein. Lantibiotika se dále dělí na dvě skupiny na základě struktury a funkce.

Lantibiotika skupiny **A** mají 20-37 aminokyselinových zbytků, spirálovitou strukturu (Chatterjee et al. 2005) a pro dehydrataci a cyklizaci používají dva různé enzymy. Jejich hlavním mechanismem účinku je tvorba pórů v cytoplazmatické membráně s využitím vazby na prekurzor peptidoglykanu - lipid II, který pomáhá ukotvit peptid do cílové membrány. Tato zároveň vazba interferuje se syntézou peptidoglykanu (Breukink a de Kruijff 1999). Jejím zástupcem je nisin produkovaný *L. lactis* objevený již roku 1933 (Whitehead 1933).

Naproti tomu lantibiotika skupiny **B** mají globulární strukturu, 19-20 aminokyselinových zbytků a za jejich modifikaci je zodpovědný jeden enzym nesoucí dehydratázovou i cyklázovou aktivitu. Látky této skupiny fungují jako inhibitory syntézy buněčné stěny. Jejím zástupcem je mersacidin, (produkovaný bakteriemi rodu *Bacillus*), který blokuje polymeraci peptidoglykanu vazbou na lipid II (Brotz et al. 1998).

Do druhé třídy bakteriocínů spadají malé (<10 kDa) termostabilní peptidy, které oproti předchozí třídě procházejí podstatně méně výraznými posttranslačními modifikacemi a neobsahují lanthionin - označují se jako **non-lantibiotika**. Mechanismus jejich účinku spočívá v tvorbě pórů v cytoplazmatické membráně citlivé buňky. Jejich klasifikace je poměrně obtížná vzhledem k velké diverzitě. Nejčastěji se dělí na 4 podskupiny.

Tab. 1. Antimikrobiální látky produkované gram-pozitivními bakteriemi

Skupina	Podskupina	Charakteristika	Velikost	Zástupce (producent)	Literatura
I. třída Lantibiotika		Silně posttranslačně modifikované peptidy obsahující lanthionin nebo methyllanthionin	<5 kDa		(Brotz a Sahl 2000)
	I. A	Helikální pórotvorné peptidy obsahující lanthionin	20-37 AK	Nisin (<i>L. lactis</i>)	(Breukink a de Kruijff 1999)
	I. B	Globulární lanthionin obsahující inhibitory enzymatických reakcí	19-20 AK	Mersacidin (druhy rodu <i>Bacillus</i>)	(Brotz et al. 1998)
II. třída Non-lantibiotika		Slabě posttranslačně modifikované pórotvorné peptidy neobsahující lanthionin	<10 kDa		(Kjos et al. 2011)
	IIa	Peptidy vykazující sekvenční homologii se zástupcem skupiny pediocínem	36-49 AK	Pediocín (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	(Kjos et al. 2011)
	IIb	Peptidy vyžadující pro svůj účinek součinnost dvou různých peptidových řetězců	26-39 AK	Lactococcin G (<i>L. lactis</i>)	(Oppegard et al. 2007)
	IIc	Cyklické peptidy s kovalentně spojeným C a N koncem	70 AK	Enterocin AS-48 (<i>E. faecalis</i>)	(Sanchez-Barrena et al. 2003)
	IId	Zbylé peptidy neodpovídající definici žádné z předchozích kategorií - lineární jednosložkové peptidy nepodobné pediocínu	-	Lactococcin A (<i>L. lactis</i>)	(Vanbelkum et al. 1991)
III. Bakteriolýziny		Velké termolabilní proteiny s doménovou strukturou hydrolyticky narušující buněčnou stěnu	29-37 kDa	Helveticin (<i>L. helveticus</i>)	(Joerger a Klaenhammer 1986)

Skupinu **IIa** tvoří tzv. "pediocin-like" bakteriocíny podle sekvenční homologie s pediocínem, antimikrobiálním peptidem produkovaným *Pediococcus acidilactici*. Vyznačují se především aktivitou proti druhům rodu *Listeria* a jako receptor na cílové membráně jim slouží manózoový transportér (Kjos et al. 2011). Do skupiny **IIb** patří dvousložkové bakteriocíny jako lactococcin G, které pro svou aktivitu (tvorba iontových kanálů) vyžadují součinnost dvou různých peptidových řetězců většinou označovaných jako alfa a beta peptid (Moll et al. 1996). Do skupiny **IIc** spadají bakteriocíny (např. enterocin AS-48) s kovalentně propojeným C a N koncem (Sanchez-Barrena et al. 2003). Zbylé peptidy nevyhovující definici předchozích skupin jsou řazeny do sběrné skupiny **IId** (Cotter et al. 2005).

Poměrně málo zastoupená **III.** třída, která se někdy považuje za samostatnou skupinu nepříbuznou ostatním bakteriocínům gram-pozitivních bakterií, se nazývá **bakteriolyzíny** a obsahuje na rozdíl od předchozích relativně velké termolabilní proteiny s doménovou strukturou, citlivé k proteázám. U senzitivních buněk hydrolyticky narušují integritu buněčné stěny (Cotter et al. 2005). Zástupcem je například helveticin J produkovaný *L. helveticus* (Joerger a Klaenhammer 1986).

3.1.2 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální látky gram-negativních bakterií

Bakteriocíny produkované gram-negativními bakteriemi se dělí na velké proteiny nazývané kolicíny a na malé termostabilní peptidy zvané mikrocíny (Tab. 2).

Velké (29-90 kDa) antimikrobiální proteiny produkované gram-negativními bakteriemi se obecně nazývají **kolicíny**, ale řadí se mezi ně i proteiny produkované jinými druhy než *E. coli* - například *Pseudomonas pyogenes* (pyocíny) nebo *Enterobacter cloacae* (cloacíny). Kolicíny mají doménovou strukturu a každá funkce (transportní, vazebná, specifická aktivita) je zajišťována samostatnou doménou. Buňky kolicíny uvolňují pouze při lyzi – produkující buňka sice zanikne, ale poskytne selekční výhodu sesterským buňkám v populaci. Kolicíny se dělí na dvě skupiny podle receptoru využívaného k přechodu přes vnější membránu cílové buňky a podle mechanismu antimikrobiálního účinku. Část kolicínů tvoří v membráně cílové buňky monomerní pór složený z jedné domény molekuly kolicínu - jediná molekula kolicínu tak stačí na zabití jedné senzitivní buňky. Druhý typ kolicínů zabíjí buňky enzymatickou aktivitou, a to buď jako cytoplazmatická nukleáza, nebo interferencí se syntézou peptidoglykanu v periplazmě (Cascales et al. 2007).

Tabulka 2. Antimikrobiální látky produkované gram-negativními bakteriemi

Skupina	Podskupina	Charakteristika	Velikost	Zástupce (producent)	Literatura
Kolicíny	kolicíny, pyocíny, pesticíny	Velké termolabilní proteiny s doménovou strukturou a pórtovnou nebo hydrolytickou (štěpí nukleové kyseliny nebo prekuzory syntézy peptidoglykanu) aktivitou	29-90 kDa Stovky AK	Colicin E1 (<i>E. coli</i>)	(Cascales et al. 2007)
Mikrocíny	mikrocíny I. třídy	Malé peptidy procházející membránou fungující intracelulárně jako inhibitory enzymatických reakcí	<5 kDa 7-43 AK	Mikrocin B17 (<i>E. coli</i>)	(Melby et al. 2011)
	mikrocíny II. třídy	Pórtovné peptidy podobné gram-pozitivním IIa bakteriocínům	7-10 kDa 60-88 AK	Mikrocin V (<i>E. coli</i>)	(Pons et al. 2002)

Mikrocíny se od kolicínů liší především velikostí (< 10 kDa) a podmínkami produkce. Bakterie je sekretují do okolí v průběhu logaritmické fáze růstu, zejména při kultivaci na chudých médiích. Mikrocíny jsou rozdělovány na dvě skupiny (Pons et al. 2002). I. třída je tvořená menšími (<5 kDa, 7-43 AK) posttranslačně modifikovanými peptidy fungujícími intracelulárně jako inhibitory enzymatických reakcí, inhibují například správnou funkci DNA gyrázy (Vizan et al. 1991). II. třída obsahuje větší (7-10 kDa, 60-88 aminokyselinových zbytků) peptidy napadající cytoplazmatickou membránu podobně jako gram-pozitivní IIa bakteriocíny.

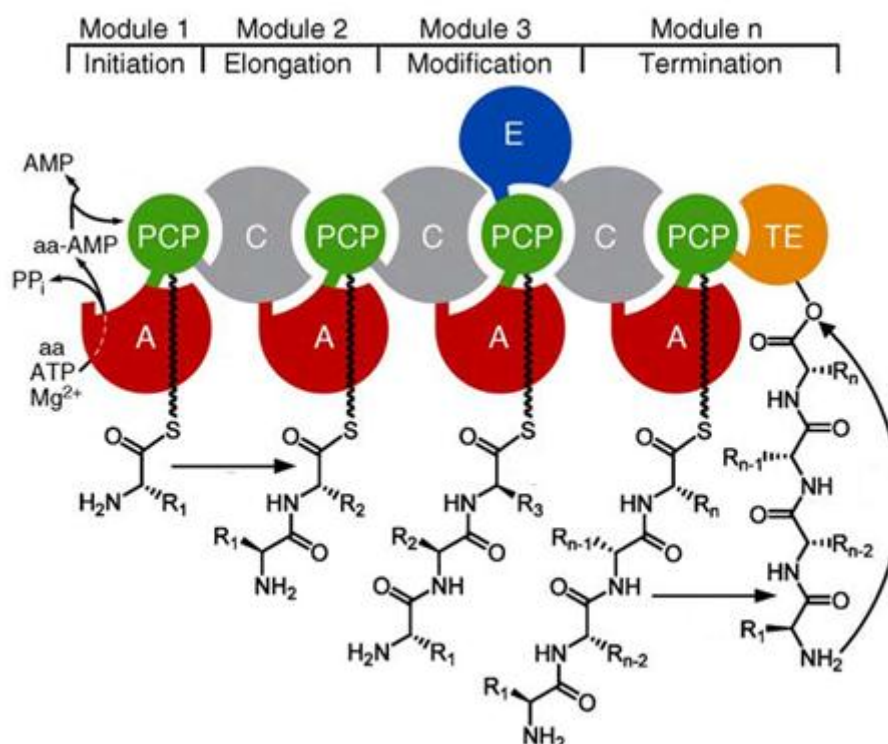
3.2 Neribozomálně syntetizované antimikrobiální látky

Neribozomálně syntetizované antimikrobiální látky jsou nesmírně rozmanitou skupinou sloučenin, do které se řadí většina běžně používaných konvenčních antibiotik. Zahrnují struktury tvořené z proteinogenních i neproteinogenních aminokyselin, lipidů, sacharidů a derivátů i fragmentů všech zmíněných látek. Podle chemického složení se dělí na glykolipidy, glykopeptidy, polyketidy a lipopeptidy (Tab. 3). Peptidické složky těchto látek jsou syntetizovány velkými (až 10 000 kDa) multienzymatickými komplexy nazývanými neribozomální peptidické syntázy (NRPS), které jsou příbuzné syntázám mastných kyselin

(Obr. 1). Tyto komplexy umožňují do peptidového řetězce zařazovat vedle proteinogenních aminokyselin i neobvyklé α -aminokyseliny, β -aminokyseliny, D-aminokyseliny, glykosilované aminokyseliny i jiné stavební prvky než aminokyseliny jako např. heterocyklické sloučeniny nebo mastné kyseliny (Grunewald a Marahiel 2006). Modulární uspořádání NRPS, kde jeden modul komplexu katalyzuje připojení jednoho konkrétního stavebního kamene k rostoucímu řetězci, umožňuje modifikovat výsledný produkt záměnou, přidáním nebo odebráním některého z modulů.

Tabulka 3. Neribozomálně syntetizované antimikrobiální látky

Skupina	Charakteristika	Zástupce (producent)	Literatura
Glykolipidy	Biosurfaktany tvořené mono- nebo oligosacharidem s jednou nebo více navázanými mastnými kyselinami.	Rhamnolipid B (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	(Chrzanowski et al. 2012)
Glykopeptidy	Komplexní struktury tvořené peptidy obsahující nekanonické aminokyseliny a glykosilované aminokyseliny	Vancomycin (<i>Amycolatopsis orientalis</i>)	(Sussmuth a Wohlleben 2004)
Polyketidy	Strukturně i funkčně různorodé sekundární metabolity vzniklé kondenzací organických kyselin	Tetracyklin (Druhy rodu <i>Streptomyces</i>)	(Staunton a Weissman 2001)
Lipopeptidy	Acylované cyklické nebo lineární peptidy s kladným nebo záporným nábojem	Daptomycin (<i>Streptomyces roseosporus</i>)	(Carpenter a Chambers 2004)



Obr. 1. Uspořádání NRPS

Obrázek schematicky znázorňuje neribozomální peptidickou syntázu složenou ze čtyř modulů, z nichž každý obsahuje několik katalytických domén. Syntéza peptidu začíná aktivací vybrané aminokyseliny (případně jiného stavebního kamene) adenylační doménou (červená A-doména), která katalyzuje připojení AMP vzniklého hydrolýzou ATP. Adenylační doména je tedy zodpovědná za výběr stavebního bloku. Aktivovaná aminokyselina je pak thioesterovou vazbou připojena na thiolovou skupinu peptid přenášejícího proteinu (zelená PCP-doména), za současného odštěpení AMP. PCP funguje jako rameno, které kyvadlovým způsobem podává rostoucí intermediát mezi jednotlivými katalytickými doménami daného modulu. Následně katalyzuje kondenzační doména (šedá C-doména) tvorbu peptidické vazby mezi thioesterovými intermediáty na dvou sousedních modulech. Syntézu peptidu ukončuje thioesterázová (oranžová TE-doména) doména na posledním modulu, která odštěpí hotový peptid z posledního PCP cyklizací peptidu, případně peptid odštěpí hydrolyticky za vzniku lineárního produktu. Některé moduly mohou obsahovat další domény zodpovědné za modifikace vznikajícího řetězce – např. epimerizační doménu (modrá E-doména) katalyzující tvorbu D-izomerů aminokyselin (upraveno z Strieker et al. 2010).

Antimikrobiální **glykolipidy** jsou monosacharidy nebo oligosacharidy s kovalentně připojenou mastnou kyselinou. Kombinace hydrofilní sacharidové a hydrofobní lipidické části řadí glykolipidy mezi biosurfaktanty, neboli povrchově aktivní látky bakteriálního původu (Desai a Banat 1997). Povrchově aktivní látky se vyznačují tím, že snižují povrchové napětí na fázových rozhraních nebo na rozhraní dvou prostředí s různou polaritou - mají detergentní, emulgační a pěnivé účinky. Nejlépe prostudované jsou rhamnolipidy produkované

Pseudomonas aeruginosa, které pravděpodobně buňkám slouží k usnadnění pohybu a příjmu hydrofobních substrátů, dále mění hydrofobicitu povrchu buňky a účastní se tvorby biofilmů (Chrzanowski et al. 2012). Navíc jako detergenty vykazují antibakteriální a antifungální účinky a jsou schopné narušovat biofilmy jiných bakteriálních druhů (*E. coli*, neprodukční kmeny *Pseudomonas aeruginosa* a druhy rodu *Vibrio*) (Kim et al. 2000; Kiran et al. 2010).

Glykopeptidické antimikrobiální látky jsou malé neribozomálně syntetizované glykosilované peptidy obsahující neproteinogenní aromatické aminokyseliny, které tvoří intramolekulární cykly. Na základě struktury byly rozděleny na 5 skupin. Skupiny I-IV mají heptapeptidovou kostru se třemi (skupina I-III) nebo čtyřmi (skupina IV) intramolekulárními cyklickými strukturami. Díky vazbě na D-Ala-D-Ala konce nascentního peptidoglykanu interferují se syntézou buněčné stěny, a vykazují tak antibakteriální účinky (Nicolaou et al. 1999; Sussmuth a Wohlleben 2004). Skupina V se naproti tomu vyznačuje přítomností pouze dvoucyklických struktur a protivirovými účinky (Tanaka et al. 1997). Nejvýznamnějším zástupcem glykopeptidů je vankomycin, antibiotikum produkované *Amycolatopsis orientalis*, které se v klinické praxi používá od roku 1958 (převzato z Nicolaou et al. 1999).

Polyketidy vznikají kondenzací organických kyselin činností multienzymatických komplexů nazývaných polyketid syntázy (PKS). Jedná se o látky různorodé z hlediska struktury i funkce. PKS jsou dvojího typu - velké modulární PKS typu I zodpovědné za syntézu komplexních polyketidů, ve kterých každá proteinová podjednotka katalyzuje jednu kondenzaci (Donadio et al. 1991). Druhou skupinu tvoří cyklické PKS typu II zodpovědné za syntézu aromatických polyketidů, ve kterých má každá proteinová podjednotka jednu enzymatickou aktivitu a jsou cyklicky používány několikrát. Mezi polyketidy patří množství konvenčních antibiotik (erytromycin A, tetracyklin) i antifungálních (mupirocin), protirakovinných (daunorubicin) a imunosupresivních (rapamycin) látek (Staunton a Weissman 2001; Kuscer et al. 2005).

Lipopeptidy (LP) se skládají z hydrofilního lineárního nebo cyklického peptidu, nesoucího kladný nebo záporný náboj, a z kovalentně připojené hydrofobní β -hydroxy nebo β -amino mastné kyseliny. Peptidická část může obsahovat D-izomery proteinogenních aminokyselin nebo i neproteinogenní aminokyseliny a tvoří makrolaktonové nebo makrolaktamové cykly. Pro svou amfipatickou povahu jsou LP stejně jako glykolipidy řazeny mezi biosurfaktanty. Svým producentům LP umožňují efektivnější pohyb, zvyšují dostupnost hydrofobních substrátů a zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, díky antimikrobiálním účinkům navíc poskytují selekční výhodu v přirozeném prostředí (Raaijmakers et al. 2010).

Antimikrobiální působení LP bylo popsáno již v první polovině 20. století u polymyxinů izolovaných z *Bacillus polymyxa* (Jones 1949). Dnes, s nástupem multirezistentních bakteriálních kmenů, zažívají lipopeptidická antibiotika renesanci - v roce 2003 byl do klinické praxe zaveden daptomycin, LP produkovaný *Streptomyces roseosporus* účinný proti gram-pozitivním bakteriím včetně methicilin rezistentních *S. aureus* (Carpenter a Chambers 2004). Gram-negativní bakterie jsou vůči účinkům daptomycinu imunní. Důvodem je pravděpodobně kombinace přítomnosti vnější membrány, jiné struktura buněčné stěny, složení cytoplazmatické membrány a chybějící senzorové kináze YycG. Ta je součástí dvoukomponentového systému YycFG, který řídí metabolismus buněčné stěny a tvorbu biofilmů některých gram-pozitivních bakterií, a je zřejmě jedním z klíčových cílů daptomycinu (Baltz 2009).

Vznik rezistence proti daptomycinu byl považován za nepravděpodobný, protože na rozdíl od většiny antibiotik neinhibuje pouze konkrétní reakci, ale jeho účinek je komplexnější - svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi především narušuje integritu cytoplazmatické membrány cílové buňky, čímž způsobuje zkratování membránového potenciálu (Straus a Hancock 2006; Baltz 2009). Přesto byly již v roce 2005 v klinických izolátech zaznamenány kmeny *S. aureus* se sníženou citlivostí k daptomycinu (Mangili et al. 2005). Necitlivé kmeny *S. aureus* byly objeveny dokonce i u daptomycin-naivních pacientů (van Hal et al. 2011) v souvislosti s rezistencí proti vankomycinu (Cui et al. 2006). Studium rezistentních kmenů ukázalo zvýšenou expresi genu *mprF*, která vede ke změně fluidity cytoplazmatické membrány zvýšením podílu kladně nabitého lysyl-fosfatidylglycerolu, a dále zvýšenou expresi *dlt* operonu, který zvyšuje pozitivní náboj buněčné stěny (Mishra et al. 2009). U rezistentního kmene *B. subtilis* byla dvacetkrát snížená citlivost způsobená jednou bodovou mutací nacházející se v genu pro syntézu fosfatidylglycerolu, která snížila negativní náboj membrány (Hachmann et al. 2011).

Pro onemocnění vyvolaná patogenními mikroorganismy rezistentními k daptomycinu, methicilinu i vankomycinu neexistuje dostupná alternativní terapie, proto je nutné vyvíjet nové antimikrobiální přípravky - jednou z možností jsou právě lipopeptidy produkované *B. subtilis*. Kromě antibakteriálních účinků byly u lipopeptidů popsány i antifungální (Vanittanakom et al. 1986; Romero et al. 2007), protivirové (Vollenbroich et al. 1997), antitumorové (Cao et al. 2009) a imunosupresivní účinky (Park a Kim 2009).

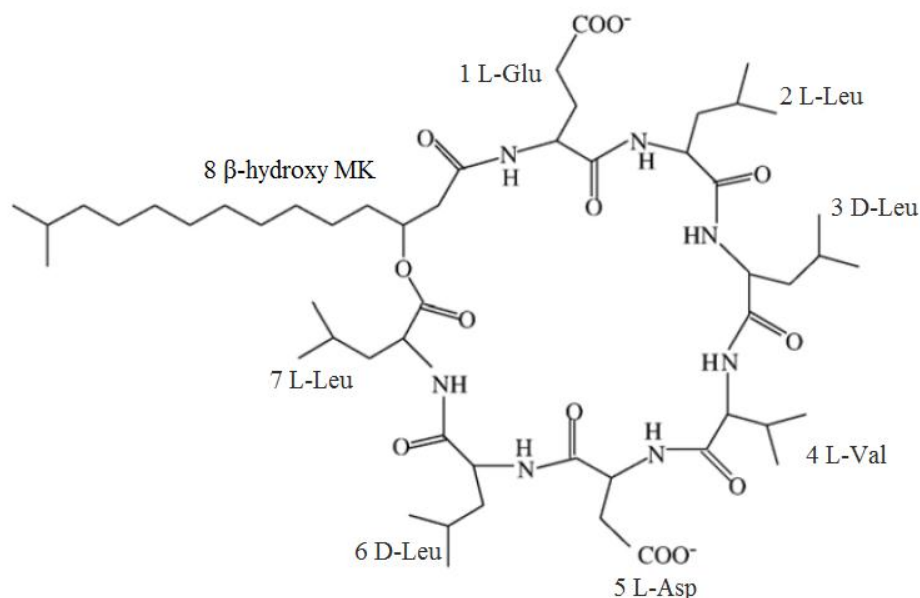
4. Lipopeptidy produkované *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je sporulující půdní bakterie, která slouží jako modelový organizmus pro studium gram-pozitivních bakterií. Bylo izolováno několik set různých kmenů druhu *Bacillus subtilis*, které produkují celkem 24 typů antimikrobiálních látek rozmanitého chemického charakteru, včetně polyketidů, lantibiotik (Stein 2005) a tří rodin lipopeptidů: Fengycinů (Vanittanakom et al. 1986), Iturinů (Delcambe a Devignat 1957) a Surfactinů (Arima et al. 1968).

4.1 Surfactiny

4.1.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti surfaktinů

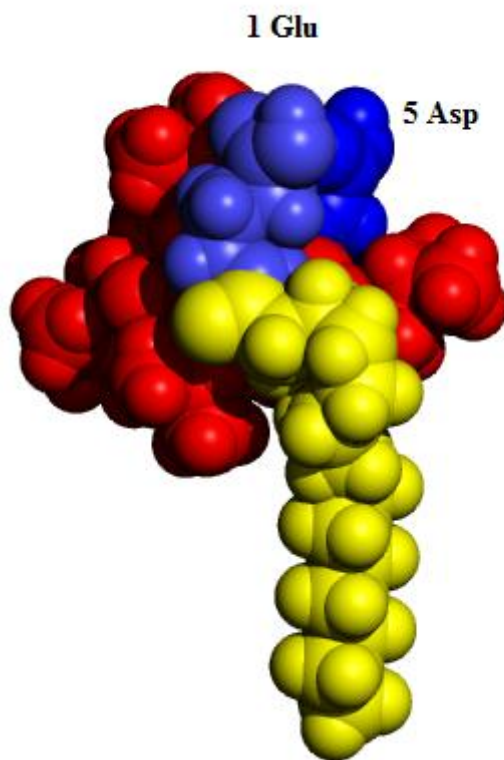
Záporně nabitý lipopeptid surfaktin patří mezi nejsilnější známé biosurfaktanty. Byl izolován již v roce 1968 (Arima et al. 1968) a jeho struktura byla popsána o rok později (Kakinuma et al. 1969). Název dostal podle své výjimečné povrchové aktivity (Surfactin - surface active). Molekula surfaktinu se skládá z heptapeptidu (Glu, Leu, D-Leu, Val, Asp, D-Leu, Leu) a β -hydroxy mastné kyseliny, jejíž hydroxy skupina tvoří s peptidem makrolaktonový cyklus (Obr. 2). Přírodní surfaktin je směsí několika izoform lišících se v peptidové sekvenci i délce a typu řetězce β -hydroxy mastné kyseliny.



Obr. 2. Primární struktura

Schéma primární struktury molekuly surfaktinu. Kovalentní spojení β -hydroxy skupiny mastné kyseliny (MK) na pozici 8 a karboxy skupiny leucinu 1 tvoří makrolaktonový kruh (upraveno z Kell et al. 2007).

Makrolaktonový kruh tvoří β -smyčky skládající se do struktury β -listu ve tvaru sedla, a to jak pomocí intra-, tak inter- molekulárních vodíkových můstků. Molekula surfaktinu je amfipatická, obsahuje jednu hydrofilní a jednu hydrofobní doménu. Minoritní hydrofilní doména, skládající se z kyselých zbytků glutamátu a aspartátu na pozicích 1 a 5, tvoří jakési klepeto a uděluje surfaktinu dva negativní náboje. Hydrofilní klepeto má schopnost silně vázat monovalentní a divalentní kationty. Majoritní hydrofobní doména je tvořena alifatickým řetězcem mastné kyseliny orientovaným na opačnou stranu než hydrofilní klepeto a ostatními aminokyselinovými zbytky. Ve vodném roztoku má samostatná molekula surfaktinu pravděpodobně kulovitý tvar s řetězcem mastné kyseliny přehnutým přes hydrofobní částí peptidu, v membránách a micelách nabývá kónický tvar (Obr. 3) (Bonmatin et al. 1994; Tsan et al. 2007). U heptapeptidu byly pozorovány dvě konformace, které pravděpodobně odpovídají surfaktinu s a bez navázaného vápenatého iontu nebo jemu příbuzného kationtu (Vass et al. 2001).



Obr. 3. Trojrozměrná struktura surfaktinu

Žlutě je obarvena mastná kyselina, červeně hydrofobní část peptidu a modře jsou obarveny hydrofilní zbytky glutamátu 1 a aspartátu 5 (Tsan et al. 2007).

Ve vodném roztoku se surfaktin silně adsorbuje na rozhraní voda-vzduch, snižuje povrchové napětí vody ze 72 na přibližně 30 mN/m při koncentraci pouhých 10 - 20 $\mu\text{mol/l}$

(Ishigami et al. 1995; Peypoux et al. 1999). Surfaktin ochotně agreguje a tvoří micely. Tuto tendenci vyjadřuje hodnota CMC (Critical Micelle Concentration), tj. koncentrace, po jejímž dosažení se začínají z monomerů surfaktantu tvořit micely. CMC je pro daný surfaktant za daných podmínek charakteristická a dá se obecně použít jako měřítko síly surfaktantu – čím nižší CMC, tím silnější povrchová aktivita. CMC surfaktinu se liší podle experimentálních podmínek (pH, teplota, iontová síla roztoku) a isoformy surfaktinu – nejvyšší aktivitu vykazuje surfaktin s délkou řetězce β -hydroxy mastné kyseliny 15 uhlíkových atomů a s klesající délkou řetězce klesá i aktivita (Deleu et al. 2003).

CMC surfaktinu dosahuje hodnot nižších než 10 $\mu\text{mol/l}$ (Ishigami et al. 1995; Heerklotz a Seelig 2001; Shen et al. 2009), může ale dosáhnout až 300 $\mu\text{mol/l}$ v roztocích s nízkou iontovou silou (Maget-Dana a Ptak 1992). Pro srovnání CMC běžně používaného detergentu Triton X-100 je přibližně 270 $\mu\text{mol/l}$ (Schott 1998). Micely surfaktinu jsou různorodé. Surfaktin může tvořit velmi malé kulovité micely s agregačním číslem 11 až 20 (Shen et al. 2009; Zou et al. 2010) i velké agregáty kulovitých tvarů, válcovitých tvarů a dvojvrstevné struktury obsahující až 170 molekul (Zou et al. 2010). Morfologie agregátů do značné míry závisí na typu kationtů tvořících komplex s hydrofilní doménou. Zatímco monovalentní kationty podporují tvorbu malých micel, divalentní kationty stimulují spíše tvorbu velkých konglomerátů (Li et al. 2009). Díky nízkým hodnotám CMC by se surfaktin mohl stát průmyslově využívaným detergentem, pokud by se podařilo snížit výrobní náklady na únosnou úroveň.

4.1.2 Interakce surfaktinu s membránami

Surfaktin narušuje bariérovou funkci lipidických membrán. Podle koncentrace surfaktinu a typu membrány buď vytváří kationtové kanály (Sheppard et al. 1991), póry (Heerklotz a Seelig 2007), nebo membránu zcela rozpustí (Obr. 4) (Carrillo et al. 2003). Koncentrace potřebné pro manifestaci těchto účinků jsou několikrát nižší než u jiných srovnatelných látek s membránovou aktivitou. Interakcí surfaktinu s modelovými membránami se zabývá mnoho studií, protože pochopení mechanismů interakce a faktorů ovlivňujících tuto aktivitu je nezbytné pro případné efektivní využití surfaktinu v medicíně nebo průmyslu. Poznatky získané *in vitro* na modelových membránách ovšem nelze jednoduše převést na membrány *in vivo*. Hlubší pochopení účinků surfaktinu na buněčné cíle proto vyžaduje další výzkum.



Obr. 4. Schematické znázornění membránově vázaného surfaktinu

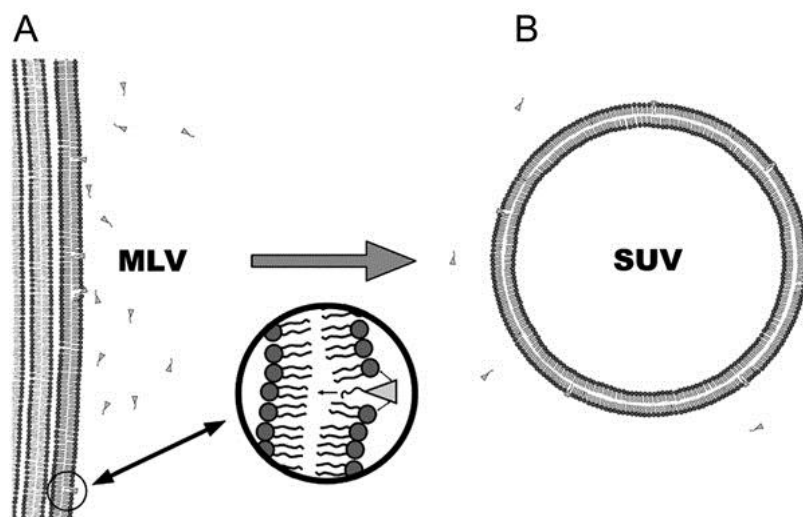
(A) Membránově vázaný surfaktin při nízké koncentraci. (B) Molekuly surfaktinu v membránové dvojvrstvě při koncentraci dostatečné pro manifestaci detergentního efektu (upraveno z Deleu et al. 2003).

Na membránovou aktivitu má zásadní vliv geometrie molekuly, délka alifatického řetězce a náboj nesený molekulou. Lineární analogy surfaktinu s rozštěpeným makrolaktonovým kruhem vykazovaly sníženou membránovou aktivitu (Dufour et al. 2005). Důvodem může být skutečnost, že cyklická struktura je esenciální pro jednoznačné rozdělení molekuly surfaktinu na hydrofilní a hydrofobní doménu. Zanesení dalšího negativního náboje do molekuly surfaktinu membránovou aktivitu oslabuje, ale posiluje povrchovou aktivitu (Francius et al. 2008; Razafindralambo et al. 2009). Prodloužení řetězce β -hydroxy mastné kyseliny způsobuje nárůst povrchové aktivity a posílení hydrofobní interakce s jádrem membrány (Razafindralambo et al. 2009). Důležitá je přítomnost iontů Ca^{2+} , se kterými tvoří komplex ve stechiometrickém poměru 1:1. Vápenatý kationt neutralizuje negativní náboje na aspartátu 5 a glutamátu 1, čímž oslabuje vzájemné elektrostatické odpuzování molekul surfaktinu a odpuzování od záporně nabitých membránových lipidů. Navíc podporuje změnu konformace surfaktinu, která způsobuje hlubší zanoření do cytoplazmatické membrány a zesiluje hydrofobní interakce s lipidickým jádrem membrány (Maget-Dana a Ptak 1992).

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím penetraci a membránovou aktivitu surfaktinu je složení cílové membrány - vliv mají jak mastné kyseliny, tak povaha polárních hlav fosfolipidů. Surfactin nejsilněji interaguje s membránovými lipidy se stejnou délkou řetězce mastných kyselin jako β -hydroxy mastná kyselina surfaktinu (Grau et al. 1999). Rostoucí délka řetězců mastných kyselin znesnadňuje inzerci surfaktinu do membrány a omezuje mísitelnost surfaktinu s membránovými fosfolipidy (mísitelnost klesá v řadě $14\text{C} > 16\text{C} > 18\text{C}$) (Maget-Dana a Ptak 1995; Bouffieux et al. 2007). Metodou AFM (Atomic Force Microscopy) bylo zjištěno, že typ polární hlavy také ovlivňuje mísitelnost surfaktinu s membránovými fosfolipidy, která klesá v řadě fosfatidylcholin $>$ fosfatidyletanolamin $>$ fosfatidylserin. Geometrie fosfolipidu hraje v interakci zásadní roli. Zatímco monovrstva válcovitého fosfatidylcholinu je surfaktinem narušována, stabilita monovrstvy kónického

fosfatidyletanolaminu se díky surfaktinu, který má tvar obráceného kužele, zvyšuje. I monovrstva tvořená fosfatidylserinem je inkorporací surfaktinu stabilizována, protože velká hlava surfaktinu snižuje hustotu náboje v silně negativně nabitě membráně, a snižuje tak elektrostatické odpuzování (Bouffieux et al. 2007). Je ovšem nutné si uvědomit, že cytoplazmatické membrány živých buněk jsou komplexnější než takovéto homogenní vrstvy tvořené pouze jedním druhem nebo dvěma druhy fosfolipidů. Interakci se surfaktinem nebo podobnými látkami budou ovlivňovat ostatní třídy fosfolipidů v membráně, ionty i proteiny a látky steroidní povahy. Takto získané poznatky jsou tedy relevantní především z hlediska fyzikálních vlastností surfaktinu a nemusí nutně popisovat reálnou situaci in vivo.

Ohledně vlivu náboje fosfolipidů na interakci surfaktinu s membránou panují nejasnosti. Podle některých autorů negativní náboj na membráně brání inkorporaci surfaktinu (Maget-Dana a Ptak 1995), podle jiných je vliv elektrostatického odpuzování oslabován kationty přítomnými v roztoku, a to pak pouze omezuje mísitelnost surfaktinu s membránovými lipidy (Eeman et al. 2006). Buchoux et al. dokonce na základě elektrostatického odpuzování surfaktinu a negativně nabitých fosfolipidů navrhli nový model mechanismu destrukce negativně nabitě membrány (Obr. 5) (Buchoux et al. 2008). Fluidita membrány pravděpodobně nijak neovlivňuje inzerci surfaktinu, rigidnější membrány ovšem snáze odolávají solubilizaci (Buchoux et al. 2008). Membranolytická aktivita surfaktinu je oslabována přítomností cholesterolu v membráně - ten stabilizuje a rigidizuje membránu a vyrovnává pnutí vzniklé vkládáním surfaktinu do vnější vrstvy membrány (Heerklotz a Seelig 2007).



Obr. 5. Narušování negativně nabité membrány nízkou koncentrací surfaktinu.

A) Mnohovrstevný váček (MLV = MultiLamellar Vesicle) a B) malý jednovrstevný váček (SUV = Small Unilamellar Vesicle). Molekula surfaktinu (trojúhelníková molekula v detailu membrány) se vnoří hydrofobní silou do membrány a elektrostatické odpuzivé síly v oblasti polárních hlav fosfolipidů způsobí lokální ohýbání a destabilizují membránu – velký mnohovrstevný váček je rozpuštěn a vznikají malé stabilnější jednovrstevné váčky (převzato z Buchoux et al. 2008).

Kónický tvar surfaktinu inzertovaného do membrány způsobuje pnutí v oblasti polárních hlav fosfolipidů a dezorganizuje uspořádání hydrofobních řetězců, čímž snižuje tloušťku a zvyšuje fluiditu membrány (Carrillo et al. 2003). Na modelových membránách bylo zaznamenáno snížení teploty fázového přechodu následkem přidání surfaktinu. Expanze vnějšího listu dvouvrstvy způsobená neschopností surfaktinu rychle se překlápět do vnitřního listu navíc způsobuje ohýbání membrány, které dále přispívá k oslabení bariérové funkce membrány (Heerklotz et al. 2004).

Při dostatečné koncentraci surfaktinu nebo spíše při dostatečném poměru membránově vázaného surfaktinu vůči membránovým lipidům dojde k úplnému rozpuštění membrány a tvorbě směsných micel. Poměr látkového množství membránově vázaného surfaktinu k látkovému množství membránových lipidů se popisuje parametrem R_b . Převádění údaje R_b na koncentraci surfaktinu v roztoku a opačně je problematické, záleží na experimentálním uspořádání. Pro studie zaměřené na mechanismus narušování integrity membrány je údaj o poměru množství surfaktinu vůči množství membránových lipidů relevantnější než jeho koncentrace v roztoku. Hodnota R_b potřebná pro solubilizaci membrány označovaná jako R_{sol} se liší podle složení membrány a experimentálních podmínek a pohybuje se od přibližně 0,2 až do 0,92. Dolní hranice hodnot R_{sol} odpovídá počátku rozpadu membrány a horní pravděpodobně odpovídá stavu, ve kterém již neexistují žádné dvouvrstevné struktury, ale

pouze směsné micely (Heerklotz a Seelig 2001; Carrillo et al. 2003; Shen et al. 2010). Typické R_{sol} surfaktinu je několikrát nižší (Triton X-100 má $R_{sol} = 0,6$) než u běžných chemických detergentů. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že surfaktin v membráně vytváří segregované domény, ve kterých je lokální koncentrace několikanásobně vyšší než koncentrace celková. V těchto surfaktinem bohatých doménách pak dochází k poruchám bariérové funkce, začíná destabilizace a nakonec rozpad membrány daleko dříve, než je dosaženo koncentrace potřebné pro úplnou solubilizaci (Nazari et al. 2012).

Při koncentracích příliš nízkých pro solubilizaci membrány se uplatňuje jiný mechanismus destabilizace membrány. Inkorporací surfaktinu vzniká pnutí, protože vnější vrstva membrány asymetricky expanduje oproti vnitřní. Od $R_b = 0,05$ (koncentrace v roztoku asi 2 $\mu\text{mol/l}$) dochází k lokálním selháním integrity membrány a k přesmyku části molekul surfaktinu do vnitřní vrstvy, čímž se pnutí opět snižuje. Postupně dojde k vyrovnání koncentrací surfaktinu v obou listech a membrána se ustálí. Když R_b dosáhne hodnoty přibližně 0,1, začne surfaktin v membráně agregovat a vytvářet segregované domény, ve kterých zřejmě dochází k selhání bariérové funkce membrány a tvorbě iontově neselektivních pórů, jejichž hydrofobní okraje jsou stabilizovány kónickými molekulami surfaktinu. Po překročení R_b 0,22 (koncentrace v roztoku 9 $\mu\text{mol/l}$) začíná solubilizace detergentním mechanismem (Heerklotz a Seelig 2007; Ostroumova et al. 2010). Tvorba iontových kanálů však byla pozorována při ještě nižší vodné koncentraci surfaktinu - 1 $\mu\text{mol/l}$. V modelové membráně se vytvářely stabilní kationt-selektivní kanály. Podle závislosti vodivosti na koncentraci surfaktinu se tvorby kanálů pravděpodobně účastní dimery surfaktinu. Jiným vysvětlením naměřené vodivosti by mohla být schopnost surfaktinu transportovat ionty přes membránu flip-flop mechanismem (Sheppard et al. 1991; Thimon et al. 1993). Permeabilizace membrány je nezávislá na transmembránovém potenciálu, ale závisí na dipólovém momentu membrány – činidla posilující dipólový moment zvyšují nárůst vodivosti membrány způsobený surfaktinem (Ostroumova et al. 2010).

4.2 Fengyciny

4.2.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti fengycinů

Lipopeptidy spadající do rodiny fengycinů (fengyciny, plipastatiny, agrastatin) se skládají z dekaeptidu (Glu, D-Orn, Tyr, D-AlloThr, Glu, D-Ala/D-Val, Pro, Gln, Tyr, Ile), který obsahuje makrolaktonový cyklus vytvořený připojením Ile 10 k hydroxy skupině Tyr 3, a

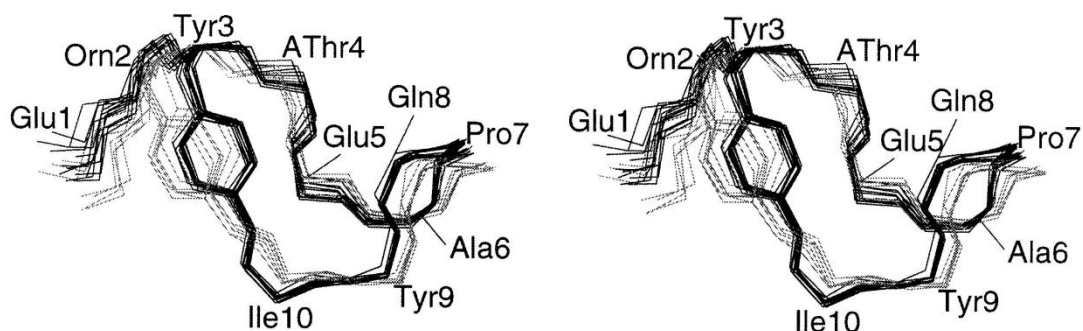
Chemical structure of the cyclic peptide **gramicidin S**, showing 10 amino acid residues:

- 1 L-Glu
- 2 D-Orn
- 3 D-AlloThr
- 4 L-Glu
- 5 D-Ala nebo D-Val
- 6 D-Pro
- 7 L-Glu
- 8 L-Tyr
- 9 L-Ile
- 10 D-Tyr

The structure includes a β -hydroxy fatty acid side chain (R) on L-Glu1 and a proline ring on D-Pro6.

Primární struktura fengycinu, R značí alifatický řetězec mastné kyseliny (upraveno z Deleu et al. 2008).

25



Obr 7. Trojrozměrná struktura plipastatinu

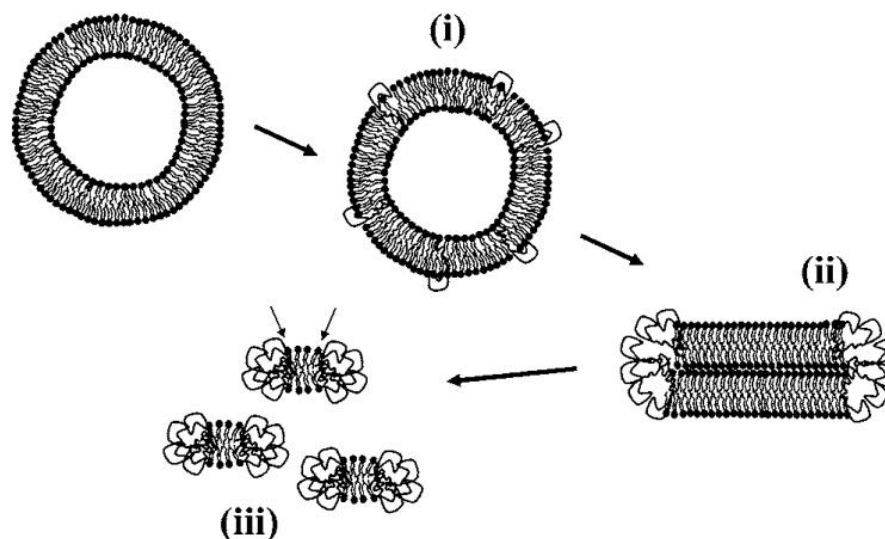
Stereoskopické znázornění prostorového uspořádání hlavního řetězce plipastatinu, lipopeptidu z rodiny fengycinů. Dekapeptid je cyklizován připojením karboxy skupiny Ile 10 k hydroxy skupině Tyr 3 (převzato z Volpon et al. 2000).

Chování fengycinu ve vodném roztoku není prozkoumáno tak detailně jako v případě surfaktinu. Fengycin má coby amfipatická látka tendenci adsorbovat se na rozhraní voda/vzduch, rozhraní prostředí s různou úrovní polaritou, popř. tvořit agregáty - micely nebo, v případě méně rozpustných variant, krystalické struktury. V důsledku rozdílného peptidického složení mohou mít fengyciny velmi rozdílné vlastnosti - například záměna Ile 4 a Val 8 v plipastatinu A za Val 4 a Ala 8 činí agrastatin samostatně prakticky nerozpustným ve vodě, jeho membránová aktivita je však zachována. Přítomnost rozpustnějších izoform fengycinů, případně jiných amfipatických lipopeptidů rozpustnost agrastatinu zvyšuje (Deleu et al. 1999; Patel et al. 2011). Krystalické struktury pak mohou fungovat jako rezervoár a udržovat vodnou koncentraci fengycinu na úrovni dostatečné pro antimikrobiální účinky, ale příliš nízké na poškození membrány producenta (Patel et al. 2011). Za stejných podmínek je CMC fengycinu srovnatelná s CMC surfaktinu - hodnota činí přibližně 7 $\mu\text{mol/l}$ u fengycinu oproti přibližně 10 $\mu\text{mol/l}$ u surfaktinu. Schopnost snižovat povrchového napětí na rozhraní voda/dodekan (na 11,63 mN/m při CMC) je však oproti surfaktinu (2,03 mN/m při CMC) znatelně menší (Deleu et al. 1999).

4.2.2 Interakce fengycinu s membránami

Podobně jako u ostatních lipopeptidů i biologické účinky fengycinů jsou založeny především na interakci s cytoplazmatickou membránou, do které je fengycin schopen se stabilně inkorporovat. β -hydroxy mastná kyselina membránově vázaného fengycinu se zanořuje do hydrofobního jádra membrány, zatímco velká peptidická část se nachází v oblasti polárních hlav. To způsobuje ohyby membrány a desorganizaci membránových lipidů (Deleu et al. 2005), vedoucí k fluidizaci membrány a snížení teploty fázového přechodu (Eeman et al.

2005; Deleu et al. 2008). Při dostatečné koncentraci (větší než 133 $\mu\text{mol/l}$, $R_b > 0,026$) fengycin v membráně agreguje, ohýbá ji a narušuje její integritu za tvorby směsných micel a diskovitých struktur, jejichž okraje jsou stabilizovány prstencem molekul fengycinu (Obr. 8) (Deleu et al. 2008).



Obr. 8. Detergentní účinky fengycinu

Při nízké koncentraci (i) je membránově vázaný fengycin ve formě monomerů a fyzikální vlastnosti ani stabilitu membrány výrazným způsobem neovlivňuje. Při vyšší koncentraci ($>133\mu\text{mol/l}$) se tvoří diskovité micely (ii) stabilizované prstencem fengycinu. Další přidávání fengycinu způsobí úplnou solubilizaci membrány (iii) za vzniku směsných micel (převzato z Deleu et al. 2008).

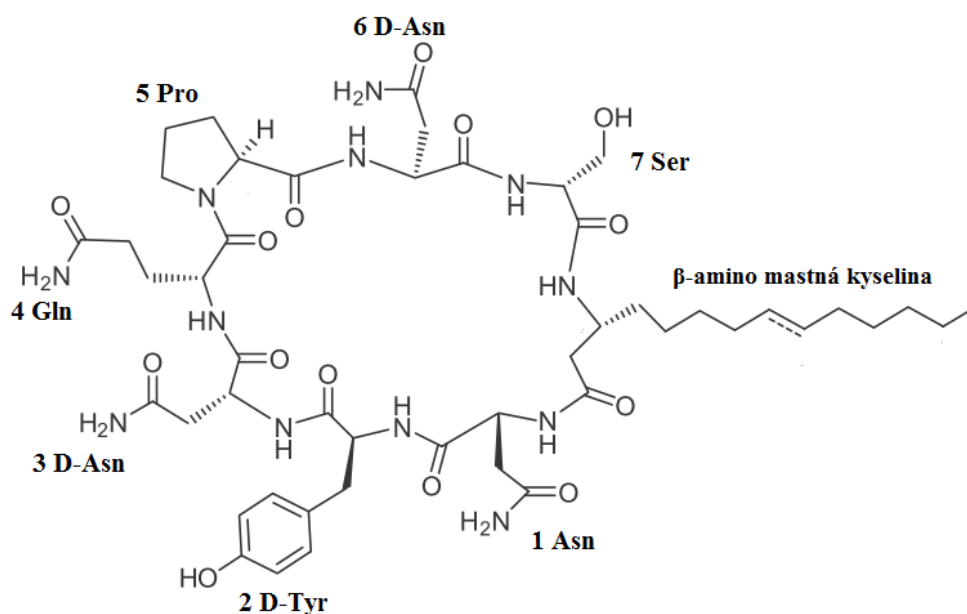
Schopnost látek permeabilizovat membránu lze in vitro studovat pomocí tzv. „leakage assay“ – sledování úniku fluorescenční sondy zabalené uvnitř membránového vaku. Z hlediska mechanismu úniku sondy se rozlišuje postupný únik, při kterém je permeabilizována membrána všech vesikulů, ale únik je relativně pomalý. Druhým typem je tzv. mechanismus vše nebo nic („all-or-none“), při jehož uplatnění vznikají v části váček velké póry, kterými unikne velmi rychle celý obsah. Fengycin je schopen způsobovat únik fluorescenční sondy z membránových váček už při koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$. Pomocí měření doby života excitovaného stavu kalceinu, který se liší pro sondu uvnitř a vně vaku a je závislý na lokální koncentraci sondy, je možné rozlišit, jaká část fluorescence pochází z kalceinu ve váčkách, jaká z kalceinu uniklého do roztoku, a dokonce zda a jak moc se snižuje koncentrace calceinu ve váčkách. Tato technika odhalila, že fengycin, na rozdíl od surfaktinů, které způsobují postupný únik ze všech váček, způsobuje únik sondy mechanismem vše nebo nic, při kterém zůstává část váček intaktních a u části dochází

k rychlému úniku veškerého obsahu. Zvyšování koncentrace fengycinu ovšem nijak výrazně nezvedá podíl otevřených váček. Z těchto zjištění vyplývá, že membránově vázaný fengycin tvoří relativně velké stabilní póry, a že jejich tvorba a existence je záležitostí rovnovážného stavu (Patel et al. 2011).

4.3 Ituriny

4.3.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti iturinů

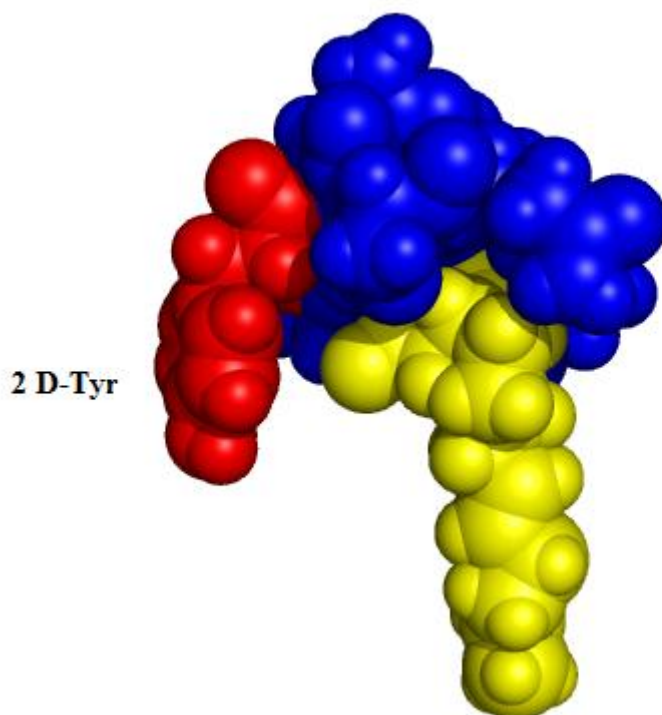
Ituriny jsou lipopeptidy nesoucí buď žádný, nebo jeden negativní náboj. Jako první z této skupiny byl z kmene *B. subtilis* získaného z půdy v zairském Ituri izolován iturin A, podle něhož byla později pojmenována celá rodina příbuzných lipopeptidů (Delcambe a Devignat 1957). Iturin A byl identifikován jako aktivní komponenta antibiotik pojmenovaných jako bacillomycin B, bacillomycin R a eumycin (Besson et al. 1976). Ituriny se skládají z heptapeptidu (Asn, D-Tyr, D-Asn, Gln, Pro, D-Asn, Ser v případě iturinu A) a β -amino mastné kyseliny (14-17 uhlíkových atomů, nasycené, nenasycené, větvené nebo lineární), jejíž β -amino skupina uzavírá s peptidem makrolaktamový cyklus (Obr. 9). Rodina iturinů je z lipopeptidů produkovaných *B. subtilis* nejrozmanitější. Konzervovaná je pouze chirální sekvence LDDLLDL a sekvence Asp/Asn, Tyr, Asn na prvních třech pozicích, tyrozinový zbytek je nezbytný pro biologickou aktivitu. Zbytek řetězce je velmi variabilní a další lipopeptidy řazené do rodiny iturinů jako mycosubtilin, bacillomycin a bacillopeptin tak mohou nabývat značně odlišných konformací, fyzikálně chemických vlastností i biologických aktivit (Maget-Dana a Peypoux 1994; Bonmatin et al. 2003).



Obr. 9. Primární struktura iturinu A

Kovalentní propojení karboxy skupiny serinu na pozici 7 a β -amino skupiny mastné kyseliny tvoří makrolaktamový kruh (upraveno z Thasana 2010).

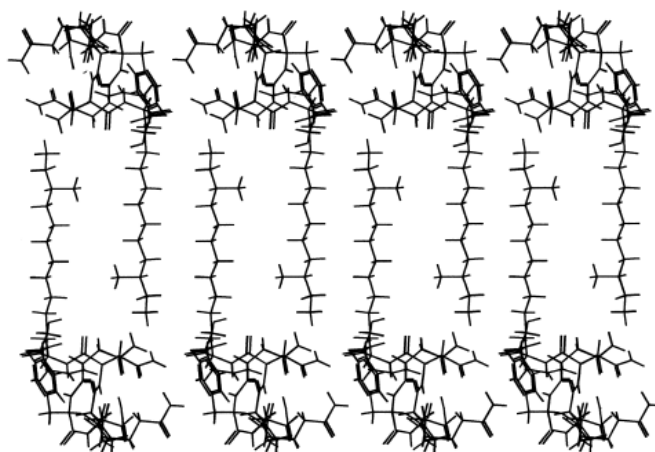
Pomocí NMR a spektroskopických analýz bylo odhaleno několik konformací makrolaktamového kruhu iturinu A, které zřejmě odpovídají různým stupňům agregace nebo penetrace do membrány (Harnois et al. 1988; Besson et al. 1996). Všechny se skládají ze dvou nebo tří β -smyček stabilizovaných intramolekulárními vodíkovými můstky. Postranní řetězce aminokyselin se mohou poměrně volně pohybovat, a účastnit se tak nejrůznějších intermolekulárních interakcí. Alifatický řetězec β -amino mastné kyseliny spolu s postranní skupinou tyrozinu na pozici 2 tvoří hydrofobní doménu zodpovědnou za interakce s lipidickým jádrem membrán a důležitou pro agregaci molekul iturinu (Obr. 10) (Garbay-Jaureguiberry et al. 1978; Besson et al. 1996). Tyrozinový zbytek je také zřejmě schopen vázat steroly, a vytvářet tak komplex iturin/sterol v poměru 1:1 (Bonmatin et al. 2003).



Obr. 10. Trojrozměrná struktura bacillomycinu Lc

Trojrozměrná struktura syntetického bacillomycinu Lc, lipopeptidu patřícího do rodiny iturinů. Mastná kyselina je obarvena žlutě, D-Tyr na pozici 2 je obarven červeně a zbytek peptidu modře (Volpon et al. 2007).

V roztocích se iturin podobně jako ostatní lipopeptidy adsorbuje na rozhraní voda/vzduch a rozhraní fází s různou mírou polaritou, kde tvoří monovrstvy a snižuje povrchové napětí, i když slaběji než surfaktin nebo fengycin (při CMC snižuje povrchové napětí na rozhraní voda/dodekan na 14,94 mN/m) (Deleu et al. 1999). Iturin také velmi ochotně agreguje a tvoří micely, forma monomeru ve vodném roztoku je energeticky nevýhodná (Harnois et al. 1988). Hodnota CMC je vyšší než v případě druhých dvou rodin lipopeptidů. Podle experimentálních podmínek se hodnoty pohybují v rozmezí od 20 $\mu\text{mol/l}$ (Deleu et al. 1999), oproti 10 $\mu\text{mol/l}$ surfaktinu za stejných podmínek (viz. kapitola 4.1.1), až přibližně 90 $\mu\text{mol/l}$ (Razafindralambo et al. 1997). Při koncentracích těsně nad hodnotou CMC iturin A tvoří malé micely složené pouze ze sedmi molekul. Při vysokých koncentracích (nad 100 $\mu\text{mol/l}$) je dokonce schopen tvořit dvojvrstevné membránové struktury a váčky. Vzhledem ke kónickému tvaru molekuly iturin vytváří dvojvrstevné struktury, ve kterých alifatický řetězec β -amino mastné kyseliny zřejmě prochází celým hydrofobním jádrem. Tato membránová struktura je držena pohromadě hydrofobními interakcemi (Obr. 11) (Grau et al. 2001).



Obr. 11. Model dvojvrstevné struktury iturinu

Pravděpodobný model dvojvrstevné membránové struktury tvořené iturinem A. Řetězce β -amino mastných kyselin procházejí celým hydrofobním jádrem membrány až k polárním hlavám protilehlé vrstvy (převzato z Grau et al. 2001).

4.3.2 Interakce iturinu s membránami

Iturin je schopen se vázat do lipidických membrán a při koncentraci přesahující CMC membrány solubilizuje a tvoří směsné micely (Besson a Michel 1984). Při koncentracích nižších než CMC je iturin schopen membrány permeabilizovat. Pomocí DSC (Differential Scanning Calorimetry) bylo zjištěno, že již při velmi nízkých koncentracích a $R_b = 0,02$ vytváří iturin A v membráně segregované domény, ve kterých je membrána tvořena pouze molekulami iturinu (Grau et al. 2000; Grau et al. 2001), podobně jako v dvojvrstevných strukturách pozorovaných v koncentrovaných roztocích iturinu (Obr. 11). Již při koncentraci pouhých 5 $\mu\text{mol/l}$ jsou tyto domény pravděpodobně propustné pro ionty (Aranda et al. 2005).

Kónický tvar molekuly iturinu zřejmě vyvolává zakřivení membrány a pravděpodobně vede k tvorbě pórů ještě před dosažením CMC. Tyto póry se v membránách erytrocytů začínají tvořit při koncentraci přibližně 10 $\mu\text{mol/l}$ a mají průměr okolo 32 Å. Jejich struktura zatím nebyla objasněna, ale zřejmě jsou tvořeny specifickým počtem molekul, protože zvýšení koncentrace iturinu nezvětšuje průměr póru (Aranda et al. 2005). Pórotvorná aktivita iturinu je také ovlivňována přítomností cholesterolu v membráně, ale na rozdíl od membránové aktivity surfaktinu, kterou cholesterol značně oslabuje, je jím podporována. Vodivost a délka trvání otevřeného stavu kanálů se s přidavkem cholesterolu znatelně zvyšuje (Maget-Dana et al. 1985).

4.4 Biologické aktivity lipopeptidů produkovaných *Bacillus subtilis*

Lipopeptidy produkované *Bacillus subtilis* vykazují zajímavé biologické aktivity využitelné v zemědělství, průmyslu i medicíně. Podrobnější analýzy ukazují, že surfaktin kromě povrchové aktivity vykazuje antibakteriální (Vollenbroich et al. 1997a; Beven a Wroblewski 1997; Tabbene et al. 2009), protivirovou (Vollenbroich et al. 1997b), antifungální (Vitullo et al. 2012), imunosupresivní, imunomodulační (Kim et al. 1998; Park a Kim 2009) a protirakovinnou aktivitu (Kameda et al. 1974; Cao et al. 2009), inhibuje tvorbu krevních sraženin (Kim et al. 2006). Byla zaznamenána i aktivita proti vývojovým stádiím komárů (Geetha et al. 2010). Naproti tomu u fengycinu a iturinu byl prokázán pouze silný antifungální účinek (Romero et al. 2007). V izolátech z produkčních kmenů *B. subtilis* se většinou nacházejí dvě nebo všechny tři rodiny lipopeptidů a lipopeptidy se navzájem ovlivňují co do fyzikálních vlastností i do biologických účinků. Bylo zaznamenáno synergistické působení surfaktinu s antifungálními účinky iturinu (Maget-Dana et al. 1992).

Kromě toho ovšem všechny tři rodiny lipopeptidů vykazují různě silnou hemolytickou aktivitu (Dufour et al. 2005; Aranda et al. 2005; Deleu et al. 2008), která částečně omezuje jejich potenciální použití v humánní medicíně. Nicméně koncentrace surfaktinu a fengycinu potřebné pro manifestaci antimikrobiálních účinků jsou nižší (maximálně desítky $\mu\text{mol/l}$) než koncentrace hemolytická, která se liší podle isoformy. U surfaktinu se hemolytická koncentrace udává až ve stovkách $\mu\text{mol/l}$, u některých variant byly ovšem za určitých podmínek zaznamenány i podstatně nižší hodnoty (Dufour et al. 2005; Kracht et al. 1999). Hemolytická aktivita fengycinu je slabší než v případě surfaktinu – Hodnota se udává až v řádech několika mmol/l (Vanittanakom et al. 1986). Ani silná hemolytická aktivita iturinu nebrání případnému zevnímu užívání.

Všechny biologické aktivity lipopeptidů *B. subtilis* přímo souvisejí se schopností těchto látek interagovat s lipidickými membránami, zvyšovat jejich permeabilitu a destabilizovat je, nebo se schopností vyvazovat jedno- a dvojmocné kationty nezbytné pro funkci některých enzymů. Studium vlivu struktury a mechanismu účinku na molekulární úrovni může navíc přinést různé deriváty těchto látek se sníženou hemolytickou aktivitou (Dufour et al. 2005).

V zemědělství je možné lipopeptidy nebo přímo produkční kmeny *B. subtilis* využívat k ochraně plodin proti patogenním mikroorganismům, a omezit tak používání méně šetrných chemických přípravků (Ongena a Jacques 2008). Další možnosti se otevírají využitím lipopeptidů jako šetrných surfaktantů při likvidaci environmentálního znečištění těžkými kovy nebo ropnými látkami (Mulligan 2009).

5. Závěr

Bacillus subtilis produkuje tři rodiny povrchově aktivních lipopeptidů s antimikrobiálními účinky. Biologické účinky těchto látek s povrchovou aktivitou velmi úzce souvisí. Všechny tři rodiny lipopeptidů svůj účinek manifestují v cytoplazmatické membráně cílových buněk, kterou destabilizují a permeabilizují. Přesný mechanismus permeabilizace a faktory, které tuto aktivitu ovlivňují, se mezi rodinami liší a podle nich se liší i spektrum aktivit jednotlivých lipopeptidů.

Lipopeptidy produkované *B. subtilis* mají, díky svým biologickým aktivitám s komplexním mechanismem účinku, velký potenciál pro využití v medicíně jako antibiotika nové generace. Vývoj rezistencí proti látkám narušujícím integritu cytoplazmatické membrány je složitější oproti klasickým antibiotikům, protože vyžaduje kompletní přestavbu membrány. Jejich skutečnému využití ale ještě musí předcházet nejen intenzivní výzkum, ale i optimalizace výrobních procesů a snížení výrobních nákladů na únosnou míru. Mnoho studií se zabývá aplikací, fyzikálními vlastnostmi a interakcemi lipopeptidů s jednoduchými modelovými membránami, ale interakcím s komplexními membránami *in vivo* je věnováno velmi málo pozornosti, přestože jsou z hlediska medicínského uplatnění zásadní. Je nutné detailněji prostudovat mechanismus účinku *in vivo* na molekulární úrovni, aby bylo možné předejít případným nežádoucím účinkům. V neposlední řadě je nezbytné popsat možné mechanismy rezistence. Dobrým modelem pro tento výzkum jsou producenti daných látek, jejichž membrány jsou k účinku produkovaných látek necitlivé.

Seznam citované literatury

- Aranda, F. J., J. A. Teruel a A. Ortiz (2005). "Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1713**(1): 51-56.
- Arima, K., A. Kakinuma a G. Tamura (1968). "Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* - isolation and characterization and its inhibition of fibrin clot formation." Biochemical and Biophysical Research Communications **31**(3): 488-&.
- Baltz, R. H. (2009). "Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering." Current Opinion in Chemical Biology **13**(2): 144-151.
- Besson, F. a G. Michel (1984). "Action of the antibiotics of the iturin group on artificial membranes." Journal of Antibiotics **37**(6): 646-651.
- Besson, F., F. Peypoux, G. Michel a L. Delcambe (1976). "Chracterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*." Journal of Antibiotics **29**(10): 1043-1049.
- Besson, F., C. Raimbault, M. L. Hourdou a R. Buchet (1996). "Solvent-induced conformational modifications of iturin A: An infrared and circular dichroic study of a L,D-lipopeptide of *Bacillus subtilis*." Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy **52**(7): 793-803.
- Beven, L. a H. Wroblewski (1997). "Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes." Research in Microbiology **148**(2): 163-175.
- Bonmatin, J. M., M. Genest, H. Labbe a M. Ptak (1994). "Solution 3-dimensional structure of surfactin - a cyclic lipopeptide studied by H-1-NMR, distance geometry, and molecular-dynamics." Biopolymers **34**(7): 975-986.
- Bonmatin, J. M., O. Laprevote a F. Peypoux (2003). "Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents." Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **6**(6): 541-556.
- Bouffieux, O., A. Berquand, M. Eeman, M. Paquot, Y. F. Dufrene, R. Brasseur a M. Deleu (2007). "Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: effect of phospholipid chain length and polar head." Biochimica Et Biophysica Acta **1768**(7): 1758-1768.
- Breukink, E. a B. de Kruijff (1999). "The lantibiotic nisin, a special case or not?" Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1462**(1-2): 223-234.
- Brotz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds a H. G. Sahl (1998). "The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **42**(1): 154-160.
- Brotz, H. a H. G. Sahl (2000). "New insights into the mechanism of action of lantibiotics - diverse biological effects by binding to the same molecular target." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **46**(1): 1-6.
- Buchoux, S., J. Lai-Kee-Him, M. Garnier, P. Tsan, F. Besson, A. Brisson a E. J. Dufourc (2008). "Surfactin-triggered small vesicle formation of negatively charged membranes: A novel membrane-lysis mechanism." Biophysical Journal **95**(8): 3840-3849.
- Cao, X. H., Z. Y. Liao, C. L. Wang, P. Cai, W. Y. Yang, M. F. Lu a G. W. Huang (2009). "Purification and antitumour activity of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus natto* TK-1." Biotechnology and Applied Biochemistry **52**: 97-106.
- Carpenter, C. F. a H. F. Chambers (2004). "Daptomycin: Another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens." Clinical Infectious Diseases **38**(7): 994-1000.
- Carrillo, C., J. A. Teruel, F. J. Aranda a A. Ortiz (2003). "Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin." Biochim Biophysica Acta **1611**(1-2): 91-97.
- Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Lloubes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin a D. Cavard (2007). "Colicin biology." Microbiology and Molecular Biology Reviews **71**(1): 158-229.
- Cotter, P. D., C. Hill a R. P. Ross (2005). "Bacterial lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential." Current Protein & Peptide Science **6**(1): 61-75.

- Cotter, P. D., C. Hill a R. P. Ross (2005). "Bacteriocins: Developing innate immunity for food." Nature Reviews Microbiology **3**(10): 777-788.
- Cui, L. Z., E. Tominaga, H. M. Neoh a K. Hiramatsu (2006). "Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(3): 1079-1082.
- Delcambe, L. a R. Devignat (1957). "L'iturine; nouvel antibiotique d'origine congolaise." Mémoires de l' Académie royale des sciences coloniales. Classe des naturelles et médicales: 1-79.
- Deleu, M., O. Bouffieux, H. Razafindralambo, M. Paquot, C. Hbid, P. Thonart, P. Jacques a R. Brasseur (2003). "Interaction of surfactin with membranes: A computational approach." Langmuir **19**(8): 3377-3385.
- Deleu, M., M. Paquot a T. Nylander (2005). "Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface - implications for the effect of fengycin on biological membranes." Journal of Colloid and Interface Science **283**(2): 358-365.
- Deleu, M., M. Paquot a T. Nylander (2008). "Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes." Biophysical Journal **94**(7): 2667-2679.
- Deleu, M., H. Razafindralambo, Y. Popineau, P. Jacques, P. Thonart a M. Paquot (1999). "Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **152**(1-2): 3-10.
- Desai, J. D. a I. M. Banat (1997). "Microbial production of surfactants and their commercial potential." Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**(1): 47-64.
- Donadio, S., M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson a L. Katz (1991). "Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis." Science **252**(5006): 675-679.
- Dufour, S., M. Deleu, K. Nott, B. Wathélet, P. Thonart a M. Paquot (2005). "Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects **1726**(1): 87-95.
- Eeman, M., A. Berquand, Y. F. Dufrene, M. Paquot, S. Dufour a M. Deleu (2006). "Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: Nanoscale interfacial organization." Langmuir **22**(26): 11337-11345.
- Eeman, M., M. Deleu, M. Paquot, P. Thonart a Y. F. Dufrene (2005). "Nanoscale properties of mixed fengycin/ceramide monolayers explored using atomic force microscopy." Langmuir **21**(6): 2505-2511.
- Francius, G., S. Dufour, M. Deleu, M. Papot, M. P. Mingeot-Leclercq a Y. F. Dufrene (2008). "Nanoscale membrane activity of surfactins: Influence of geometry, charge and hydrophobicity." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1778**(10): 2058-2068.
- Garbay-Jaureguiberry, C., B. P. Roques a L. Delcambe (1978). "NMR conformational study of iturin A, an antibiotic from *Bacillus subtilis*." Febs Letters **93**(1): 151-156.
- Garcia-Olmedo, F., P. Rodriguez-Palenzuela, A. Molina, J. M. Alamillo, E. Lopez-Solanilla, M. Berrocal-Lobo a C. Poza-Carrion (2001). "Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence." Febs Letters **498**(2-3): 219-222.
- Geetha, I., A. M. Manonmani a K. P. Paily (2010). "Identification and characterization of a mosquito pupicidal metabolite of a *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* strain." Applied Microbiology and Biotechnology **86**(6): 1737-1744.
- Giuliani, A., G. Pirri a S. F. Nicoletto (2007). "Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics." Central European Journal of Biology **2**(1): 1-33.
- Grau, A., J. C. Gomez-Fernandez, F. Peypoux a A. Ortiz (2001). "Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A." Peptides **22**(1): 1-5.
- Grau, A., J. C. Gomez Fernandez, F. Peypoux a A. Ortiz (1999). "A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1418**(2): 307-319.
- Grau, A., A. Ortiz, A. de Godos a J. C. Gomez-Fernandez (2000). "A biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers." Archives of Biochemistry and Biophysics **377**(2): 315-323.
- Grunewald, J. a M. A. Marahiel (2006). "Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides." Microbiology and Molecular Biology Reviews **70**(1): 121-+.

- Hachmann, A. B., E. Sevim, A. Gaballa, D. L. Popham, H. Antelmann a J. D. Helmann (2011). "Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*." Antimicrob Agents Chemother **55**(9): 4326-4337.
- Harnois, I., D. Genest, J. C. Brochon a M. Ptak (1988). "Micellization and interactions with phospholipid-vesicles of the lipopeptide iturin-A, as monitored by time-resolved fluorescence of a D-tyrosyl residue." Biopolymers **27**(9): 1403-1413.
- Heerklotz, H. a J. Seelig (2001). "Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes." Biophysical Journal **81**(3): 1547-1554.
- Heerklotz, H. a J. Seelig (2007). "Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin." European Biophysical Journal **36**(4-5): 305-314.
- Heerklotz, H., T. Wiprecht a J. Seelig (2004). "Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium." Journal of Physical Chemistry B **108**(15): 4909-4915.
- Honma, M., K. Tanaka, K. Konno, K. Tsuge, T. Okuno a M. Hashimoto (2012). "Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX." Bioorganic & Medicinal Chemistry **20**(12): 3793-3798.
- Chatterjee, C., M. Paul, L. L. Xie a W. A. van der Donk (2005). "Biosynthesis and mode of action of lantibiotics." Chemical Reviews **105**(2): 633-683.
- Chrzanowski, L., L. Lawniczak a K. Czarczyk (2012). "Why do microorganisms produce rhamnolipids?" World Journal of Microbiology & Biotechnology **28**(2): 401-419.
- Ishigami, Y., M. Osman, H. Nakahara, Y. Sano, R. Ishiguro a M. Matsumoto (1995). "Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **4**(6): 341-348.
- Joerger, M. C. a T. R. Klaenhammer (1986). "Characterization and purification of helveticin-J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481." Journal of Bacteriology **167**(2): 439-446.
- Jones, T. S. G. (1949). "Chemical evidence for the multiplicity of the antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*." Annals of the New York Academy of Sciences **51**(5): 909-916.
- Kakinuma, A., M. Hori, M. Isono, G. Tamura a K. Arima (1969). "Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 971-997.
- Kameda, Y., S. Ouhira, K. Matsui, S. Kanatomo, T. Hase a T. Atsutsuka (1974). "Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **22**(4): 938-944.
- Kell, H., J. F. Holzwarth, C. Boettcher, R. K. Heenan a J. Vater (2007). "Physicochemical studies of the interaction of the lipopeptide surfactin with lipid bilayers of L-alpha-dimyristoyl phosphatidylcholine." Biophysical Chemistry **128**(2-3): 114-124.
- Kim, B. S., J. Y. Lee a B. K. Hwang (2000). "In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*." Pest Management Science **56**(12): 1029-1035.
- Kim, K., S. Y. Jung, D. K. Lee, J. K. Jung, J. K. Park, D. K. Kim a C. H. Lee (1998). "Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A(2)." Biochemical Pharmacology **55**(7): 975-985.
- Kim, S. D., S. K. Park, J. Y. Cho, H. J. Park, J. H. Lim, H. I. Yun, S. C. Park, K. Y. Lee, S. K. Kim a M. H. Rhee (2006). "Surfactin C inhibits platelet aggregation." Journal of Pharmacy and Pharmacology **58**(6): 867-870.
- Kiran, G. S., B. Sabarathnam a J. Selvin (2010). "Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*." Fems Immunology and Medical Microbiology **59**(3): 432-438.
- Kjos, M., J. Borrero, M. Opsata, D. J. Birri, H. Holo, L. M. Cintas, L. Snipen, P. E. Hernandez, I. F. Nes a D. B. Diep (2011). "Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria." Microbiology-Sgm **157**: 3256-3267.
- Kracht, M., H. Rokos, M. Ozel, M. Kowall, G. Pauli a J. Vater (1999). "Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives." Journal of Antibiotics **52**(7): 613-619.

- Kuscer, E., P. Raspor a H. Petkovic (2005). "Rational design of polyketide natural products." Food Technology and Biotechnology **43**(4): 403-410.
- Lavery, G., S. P. Gorman a B. F. Gilmore (2011). "The potential of antimicrobial peptides as biocides." International Journal of Molecular Science **12**(10): 6566-6596.
- Lavery, G., M. McLaughlin, C. Shaw, S. P. Gorman a B. F. Gilmore (2010). "Antimicrobial Activity of Short, Synthetic Cationic Lipopeptides." Chemical Biology & Drug Design **75**(6): 563-569.
- Li, Y., A. H. Zou, R. Q. Ye a B. Z. Mu (2009). "Counterion-Induced Changes to the Micellization of Surfactin-C-16 Aqueous Solution." Journal of Physical Chemistry B **113**(46): 15272-15277.
- Li, Y. F. (2011). "Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review." Protein Expression and Purification **80**(2): 260-267.
- López-Meza, J. E., A. Ochoa-Zarzosa, J. A. Aguilar a P. D. Loeza-Lara (2011). Antimicrobial peptides: Diversity and perspectives for their biomedical application, Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. M. A. Komorowska and S. Olsztyńska-Janus, InTech.
- Maget-Dana, R. a F. Peypoux (1994). "Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides - biological and physicochemical properties." Toxicology **87**(1-3): 151-174.
- Maget-Dana, R. a M. Ptak (1992). "Interfacial Properties of Surfactin." Journal of Colloid and Interface Science **153**(1): 285-291.
- Maget-Dana, R. a M. Ptak (1995). "Interactions of surfactin with membrane models." Biophysical Journal **68**(5): 1937-1943.
- Maget-Dana, R., M. Ptak, F. Peypoux a G. Michel (1985). "Pore-forming properties of Iturin-A, a lipopeptide antibiotic." Biochimica Et Biophysica Acta **815**(3): 405-409.
- Maget-Dana, R., L. Thimon, F. Peypoux a M. Ptak (1992). "Surfactin iturin-A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin-A." Biochimie **74**(12): 1047-1051.
- Mangili, A., I. Bica, D. R. Snyderman a D. H. Hamera (2005). "Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia." Clinical Infectious Diseases **40**(7): 1058-1060.
- Maroti, G., A. Kereszt, E. Kondorosi a P. Mergaert (2011). "Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals." Research in Microbiology **162**(4): 363-374.
- Melby, J. O., N. J. Nard a D. A. Mitchell (2011). "Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates." Current Opinion in Chemical Biology **15**(3): 369-378.
- Mishra, N. N., S. J. Yang, A. Sawa, A. Rubio, C. C. Nast, M. R. Yeaman a A. S. Bayer (2009). "Analysis of Cell Membrane Characteristics of In Vitro-Selected Daptomycin-Resistant Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(6): 2312-2318.
- Moll, G., T. Ubbink-Kok, H. Hildeng-Hauge, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, W. N. Konings a A. J. M. Driessen (1996). "Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin." Journal of Bacteriology **178**(3): 600-605.
- Mulligan, C. N. (2009). "Recent advances in the environmental applications of biosurfactants." Current Opinion in Colloid & Interface Science **14**(5): 372-378.
- Nazari, M., M. Kurdi a H. Heerklotz (2012). "Classifying Surfactants with Respect to Their Effect on Lipid Membrane Order." Biophysical Journal **102**(3): 498-506.
- Nicolaou, K. C., C. N. C. Boddy, S. Brase a N. Winssinger (1999). "Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics." Angewandte Chemie-International Edition **38**(15): 2097-2152.
- NissenMeyer, J. a I. F. Nes (1997). "Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and mechanism of action." Archives of Microbiology **167**(2-3): 67-77.
- Ongena, M. a P. Jacques (2008). "*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol." Trends in Microbiology **16**(3): 115-125.
- Oppegard, C., P. Rogne, L. Emanuelsen, P. E. Kristiansen, G. Fimland a J. Nissen-Meyer (2007). "The two-peptide class II bacteriocins: Structure, production, and mode of action." Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **13**(4): 210-219.
- Ostroumova, O. S., V. V. Malev, M. G. Ilin a L. V. Schagina (2010). "Surfactin Activity Depends on the Membrane Dipole Potential." Langmuir **26**(19): 15092-15097.

- Park, S. Y. a Y. Kim (2009). "Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK-kappa B, MAPK and Akt pathway." International Immunopharmacology **9**(7-8): 886-893.
- Patel, H., C. Tscheka, K. Edwards, G. Karlsson a H. Heerklotz (2011). "All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1808**(8): 2000-2008.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin a J. Wallach (1999). "Recent trends in the biochemistry of surfactin." Applied Microbiology and Biotechnology **51**(5): 553-563.
- Pons, A. M., I. Lanneluc, G. Cottenceau a S. Sable (2002). "New developments in non-post translationally modified microcins." Biochimie **84**(5-6): 531-537.
- Raaijmakers, J. M., I. de Bruijn, O. Nybroe a M. Ongena (2010). "Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics." Fems Microbiology Reviews **34**(6): 1037-1062.
- Razafindralambo, H., S. Dufour, M. Paquot a M. Deleu (2009). "Thermodynamic studies of the binding interactions of surfactin analogues to lipid vesicles. Application of isothermal titration calorimetry." Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **95**(3): 817-821.
- Razafindralambo, H., Y. Popineau, M. Deleu, C. Hbid, P. Jacques, P. Thonart a M. Paquot (1997). "Surface-active properties of surfactin iturin A mixtures produced by *Bacillus subtilis*." Langmuir **13**(23): 6026-6031.
- Rogers, H. J., N. Lomakina a E. P. Abraham (1965). "Observations on structure of bacilysin." Biochemical Journal **97**(2): 579-586.
- Romero, D., A. de Vicente, R. H. Rakotoaly, S. E. Dufour, J. W. Veening, E. Arrebola, F. M. Cazorla, O. P. Kuipers, M. Paquot a A. Perez-Garcia (2007). "The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(4): 430-440.
- Sanchez-Barrena, M. J., M. Martinez-Ripoll, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, V. Cruz a A. Albert (2003). "Structure of bacteriocin AS-48: From soluble state to membrane bound state." Journal of Molecular Biology **334**(3): 541-549.
- Shen, H. H., R. K. Thomas, C. Y. Chen, R. C. Darton, S. C. Baker a J. Penfold (2009). "Aggregation of the naturally occurring lipopeptide, surfactin, at interfaces and in solution: An unusual type of surfactant?" Langmuir **25**(7): 4211-4218.
- Shen, H. H., R. K. Thomas, J. Penfold a G. Fragneto (2010). "Destruction and solubilization of supported phospholipid bilayers on silica by the biosurfactant surfactin." Langmuir **26**(10): 7334-7342.
- Sheppard, J. D., C. Jumarie, D. G. Cooper a R. Laprade (1991). "Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer-membranes." Biochimica Et Biophysica Acta **1064**(1): 13-23.
- Schott, H. (1998). "Comparing the surface chemical properties and the effect of salts on the cloud point of a conventional nonionic surfactant, octoxynol 9 (Triton X-100), and of its oligomer, tyloxapol (Triton WR-1339)." Journal of Colloid and Interface Science **205**(2): 496-502.
- Schweizer, F. (2009). "Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity." European Journal of Pharmacology **625**(1-3): 190-194.
- Silverstein, K. A. T., W. A. Moskal, H. C. Wu, B. A. Underwood, M. A. Graham, C. D. Town a K. A. VandenBosch (2007). "Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants." Plant Journal **51**(2): 262-280.
- Staunton, J. a K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Natural Product Reports **18**(4): 380-416.
- Stein, T. (2005). "*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions." Molecular Microbiology **56**(4): 845-857.
- Straus, S. K. a R. E. W. Hancock (2006). "Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1758**(9): 1215-1223.
- Strieker, M., A. Tanovic a M. A. Marahiel (2010). "Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics." Current Opinion in Structural Biology **20**(2): 234-240.

- Sussmuth, R. D. a W. Wohlleben (2004). "The biosynthesis of glycopeptide antibiotics - a model for complex, non-ribosomally synthesized, peptidic secondary metabolites." Applied Microbiology and Biotechnology **63**(4): 344-350.
- Tabbene, O., I. Ben Slimene, F. Bouabdallah, M. L. Mangoni, M. C. Urdaci a F. Limam (2009). "Production of anti-methicillin-resistant *staphylococcus* activity from *Bacillus subtilis* sp strain B38 newly isolated from soil." Applied Biochemistry and Biotechnology **157**(3): 407-419.
- Tanaka, H., K. Matsuzaki, H. Nakashima, T. Ogino, A. Matsumoto, H. Ikeda, H. B. Woodruff a S. Omura (1997). "Chloropeptins, new anti-HIV antibiotics inhibiting gp120-CD4 binding from *Streptomyces* sp .1. Taxonomy, fermentation, isolation, and physico-chemical properties and biological activities." Journal of Antibiotics **50**(1): 58-65.
- Thasana, N., B. Prapagdee, N. Rangkadilok, R. Sallabhan, S. L. Aye, S. Ruchirawat a S. Loprasert (2010). "*Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated beta-amino acid." Febs Letters **584**(14): 3209-3214.
- Thimon, L., F. Peypoux, J. Wallach a G. Michel (1993). "Ionophorus and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **1**(1): 57-62.
- Timmis, K. (1972). "Purification and characterization of colicin-D." Journal of Bacteriology **109**(1): 12-20.
- Tsan, P., L. Volpon, F. Besson a J. M. Lancelin (2007). "Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media." Journal of the American Chemical Society **129**(7): 1968-1977.
- van Hal, S. J., D. L. Paterson a I. B. Gosbell (2011). "Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient-a review of the literature." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **30**(5): 603-610.
- Vanbelkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings a T. Abee (1991). "The bacteriocin lactococcin-A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage dependent manner." Journal of Bacteriology **173**(24): 7934-7941.
- Vanittanakom, N., W. Loeffler, U. Koch a G. Jung (1986). "Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3." Journal of Antibiotics **39**(7): 888-901.
- Vass, E., F. Besson, Z. Majer, L. Volpon a M. Hollosi (2001). "Ca²⁺-induced changes of surfactin conformation: A FTIR and circular dichroism study." Biochemical and Biophysical Research Communications **282**(1): 361-367.
- Vitullo, D., A. Di Pietro, A. Romano, V. Lanzotti a G. Lima (2012). "Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*." Plant Pathology **61**(4): 689-699.
- Vizan, J. L., C. Hernandezchico, I. Delcastillo a F. Moreno (1991). "The peptide antibiotic microcin B17 induces a double-strand cleavage of DNA mediated by *Escherichia coli* DNA gyrase." Embo Journal **10**(2): 467-476.
- Vollenbroich, D., M. Ozel, J. Vater, R. M. Kamp a G. Pauli (1997b). "Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*." Biologicals **25**(3): 289-297.
- Vollenbroich, D., G. Pauli, M. Ozel a J. Vater (1997a). "Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*." Applied and Environmental Microbiology **63**(1): 44-49.
- Volpon, L., F. Besson a J. M. Lancelin (2000). "NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A(2)." Febs Letters **485**(1): 76-80.
- Volpon, L., P. Tsan, Z. Majer, E. Vass, M. Hollosi, V. Noguera, J. M. Lancelin a F. Besson (2007). "NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics." Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy **67**(5): 1374-1381.
- Wang, G. S., X. Li a Z. Wang (2009). "APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design." Nucleic Acids Research **37**: D933-D937.
- Whitehead, H. R. (1933). "A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci." The Biochemical Journal **27**: 1793-1800.

- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-395.
- Zou, A. H., J. Liu a B. Z. Mu (2010). "Interaction between the natural lipopeptide Glu(1), Asp(5) surfactin-C15 and hemoglobin: A spectroscopic and electrochemical investigation." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **369**(1-3): 154-159.